

平成 30 年 7 月 18 日現在

機関番号：12602

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2014～2016

課題番号：26702013

研究課題名(和文) ボロン酸を利用した新規イオンシーケンシング法の開発

研究課題名(英文) Development of ion-sequencing method using boronic acid

研究代表者

松元 亮 (Matsumoto, Akira)

東京医科歯科大学・生体材料工学研究所・准教授

研究者番号：70436541

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 18,500,000円

研究成果の概要(和文)：いくつかのピリジル系ヘテロ環含有ボロン酸誘導体が、ピロリン酸とその一部の誘導体と特異的かつ可逆的、pH依存的に結合することを定量的に明らかにした。この知見を元に、電極修飾材料を開発し、ピロリン酸を30  $\mu$ M以上の感度で電位検出することに成功した。さらに、ピロリン酸に応答して溶解性転移を呈する材料を新たに創成し、溶液条件等を最適化することにより、核酸増幅反応におけるサーマルサイクルとの組み合わせにより、より高感度かつ簡便な電気的計測を可能とする方法論を開発した。

研究成果の概要(英文)：We found that a heterocyclic class of boronic acids, based on the pyridine structures, can interact with pyrophosphate and some of its derivatives in a specific, reversible and pH-dependent manner. Based on this finding, we prepared a series of boronate-modified electrodes and confirmed their sensitivity to pyrophosphate with the detection limit of 30  $\mu$ M. Moreover, we designed a polymeric material that is able to undergo a sharp inversion in the state of hydration in synchronization with recognition of pyrophosphate. In combination with a common thermal cycle protocol in nucleotide amplification reactions, our finding may help dramatically simplify those ongoing technologies.

研究分野：生体計測、ドラッグデリバリーシステム

キーワード：ボロン酸 ピロリン酸 核酸増幅

## 1. 研究開始当初の背景

2011年に、DNAシーケンサの最大手であるLife Technology社より、世界初の集積化トランジスタによるDNAシーケンサが上市されている。これは、トランジスタのゲート電極上で4種類のデオキシヌクレオシド三リン酸(dNTP)を順次加えながら、DNAポリメラーゼによる相補鎖合成を行わせた際に放出されるプロトンを連続的に計測することで配列を決定する方式である。その後、トランジスタの集積化度の向上とも相俟って、価格、スループットの両面において既存法を凌駕する技術水準に至った。しかしながら、そのポテンシャルを最大限引き出すための要素課題に「1ランあたり読み取り塩基長の改善」が挙げられ、その主因は「低緩衝能溶液中における酵素反応の非効率性」にあると考えられた。すなわち、pHセンサーによりプロトンを捉える現方式では、反応溶液の緩衝能を極力抑える必要があるが、そのような条件下で酵素反応を繰り返すと「酵素の最適pHからの乖離」=「活性の低下」が容易に起こるため、読み取り長さとしては200塩基程度が信頼性の限界となる。このジレンマを回避するためには、現行のプロトン検出方式ではなく、プロトンと同様に一塩基伸長時間に一分子生成するピロリン酸(二リン酸)分子の検出が有効と考えた。すなわち、従来の「pH電極」を「ピロリン酸を特異的に捉える電極」に置き換えたパイロシーケンシングを実施することにより、高緩衝能溶液中での酵素反応を許容し、上記の課題を根本的に解決できるものと考えた。ピロリン酸の電気的な検出に適用可能なレセプター分子としては、ピコリルアミン誘導体を配位子とする金属錯体が知られていたが、その結合は比較的強く、電極界面で可逆的に誘起するピロリン酸分子の拡散過程を経時観測する用途には不向きである。研究代表者らは、ピリジルボロン酸誘導体を用い、上記プロトコルはそのままに、ピロリン酸を特異的に検出する原理を着想した。上記レセプターとは対照的に、これらの分子間の結合定数は溶液の交換(希釈)のみで容易に解離しうること、また(合成反応の際に共存する)dNTPとの相互作用が皆無なことから、上記プロトコルとの親和性が高いものと考えた。

## 2. 研究の目的

本研究は、研究代表者らが見いだした「ピリジルボロン酸-ピロリン酸間で生じる特異的かつ可逆的な共有結合」を分子機序とする、新たなイオン検出方式のDNA配列解析技術の原理証明を目的とした。従来のプロトン検出方式シーケンサは、既に「1000ドルゲノム」を手中に収めつつあるが、原理上、酵素反応に不利な低緩衝能溶液を使用する必要があり、1ランあたりの読み取り塩基長は

200程度にとどまる。DNAポリメラーゼによる相補鎖合成反応において、プロトン同様に一分子生成するピロリン酸を捉えるアプローチをとることで、高緩衝能溶液中での酵素反応を許容し、読み取り塩基長の改善に繋がる技術開発を目指した。

## 3. 研究の方法

$^{11}\text{B-NMR}$ 、 $^{31}\text{P-NMR}$ 、蛍光色素(アリザリンレッドS)を利用した競合アッセイ法等により、種々のピリジルまたはピリミジル骨格を有するボロン酸誘導体とピロリン酸との結合強度、特異性、pH依存性などについて評価した。さらに、アルカンチオール構造と組み合わせた新たな金電極修飾分子を合成した。この電極を用いてピロリン酸の電位検出を実施した。さらに、当該構造をアクリルアミド誘導体化し、これを他のアクリルアミドモノマーと共重合とすることで、ピロリン酸に応答して溶解性転移を呈する材料を新たに創成した。これを利用したピロリン酸応答電極を評価するとともに、PCR(ポリメラーゼ連鎖反応)等の増幅反応検出系への応用を図るため、その溶液条件の最適化を並行して実施した。

## 4. 研究成果

上記、系統的な結合性評価を通じ、いくつかのピリジルおよびピリミジリルボロン酸誘導体が、ピロリン酸とその一部の誘導体と特異的かつ可逆的(結合定数 $\sim 10^3 \text{ M}^{-1}$ )に結合することを定量的に明らかにした。その結合強度はpH依存性であり、いずれも弱酸性領域(pH5-6)で最大化するものであった。興味深いことに、一リン酸や三リン酸とは全く結合せず、高塩濃度下(500 mM NaCl)でもこの選択性は不変であり、dNTPなどの三リン酸化合物とは全く結合しないため、電極融合型のパイロシーケンシングやPCR検出系への応用可能性が視野に入った。さらに、この電極を用い、上記の弱酸性環境下で、ピロリン酸を $30\mu\text{M}$ 以上の感度で電位検出することに成功した。この検出感度は、上記Life Technology社方式に直ちに適用可能な水準である。さらに、当該構造をアクリルアミド誘導体化し、これを感温性材料として知られるpoly(N-isopropylacrylamide)(PNIPAAm)との共重合体とすることで、ピロリン酸に応答して溶解性転移を呈する材料を新たに創成した。以前の研究から、電極表面で生起する溶解性転移(水和・脱水和)に伴う著しい誘電率変化が、電位測定時の効果的なシグナル増幅モードとして機能することが明らかにしている。本方式の付加価値として、その転移温度を適度に設定することで、PCR法におけるサーマルサイクルとの組み合わせにより、より高感度かつ簡便な電気的手法の創出が期待される。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 5 件)

1. Matsumoto A, Tanaka M, Matsumoto H, Ochi K, Moro-Oka Y, Kuwata H, Yamada H, Shirakawa I, Miyazawa T, Ishii H, Kataoka K, Ogawa Y, Miyahara Y, Suganami T. Synthetic "smart gel" provides glucose-responsive insulin delivery in diabetic mice. *Sci Adv.* 2017, 3, eaaq0723. doi: 10.1126/sciadv.aaq0723 (査読あり)
2. Akira Matsumoto, Shohei Sato, Tomoko Sakamaki, Mai Sanjo, Miyuki Tabata, Tatsuro Goda, Taka-aki Asoh, Akihiko Kikuchi, Yuji Miyahara, "Demonstration of Thermo-Sensitive Tetra-Gel with Implication for Facile and Versatile Platform for a New Class of Smart Gels", *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.*, 2017, 28, 1000-1009. DOI: 10.1080/09205063.2017.1316536. (査読あり)
3. Akira Matsumoto, Yuji Miyahara, Borono-lectin" based Engineering as a Versatile Platform for Biomedical Applications, *Sci. Technol. Adv. Mater.* 2017, 19(1), 18-30. doi:oi10.1080/14686996.2017.1411143 (査読あり)
4. 松元亮、生体分子との相性が抜群な「ボロン酸工学」の発展を目指して、*NanoSky*, 2017, 3, 13. (査読なし)
5. Akira Matsumoto, Mai Yuasa, Hiroko Matsumoto, Mai Sanjo, Miyuki Tabata, Tatsuro Goda, Toru Hoshi, Takao Aoyagi, Yuji Miyahara, "Boronate Functionalized Polymer Gel Based Insulin Delivery System with Improved Stability in Performance: A Comparative Structure-Function Study",

*Chem. Lett.*, 2016, 45(4), 460-462.  
DOI: 10.1246/cl.151177. (査読あり)

[学会発表] (計 19 件)

1. Akira Matsumoto, Synthetic boronate gel-driven "closed-loop" insulin delivery system with feasible safety and efficacy in mice, 11th International Gel Symposium, Nihon University (千葉県習志野市), March 9, 2017.
2. 松元 亮, 体に貼りつける人工膵臓デバイス、(独)日本学術振興会先端ナノデバイス・材料テクノロジー第151委員会 平成28年度第7回研究会、LiSE 川崎生命科学・環境研究センター(川崎市殿町)、2017年3月2日.
3. 松元亮, 「糖尿病患者のQOL向上を目指したエレクトロニクスフリーな人工膵臓の開発」、再生・細胞医療産業化促進セミナー、ライフイノベーションセンター(神奈川県川崎市殿町)、2016年12月8日.
4. 松元亮, ボロノレクチンを利用した生体計測とドラッグデリバリーシステム、化学特別講義2セミナー、東京理科大学神楽坂キャンパス(東京都新宿区)、2016年12月7日.
5. Matsumoto A, Suganami T, Matsumoto H, Tanaka M, Ochi K, Moro-oka Y, Ogawa Y, Ishii T, Kataoka K, Miyahara Y, Electronics-free and synthetic polymeric materials based approach toward artificial pancreas, 3rd International Conference on Biomaterials Science in Tokyo, Tokyo, Japan (東京大学、東京都文京区), November 28-30, 2016.
6. Sakamaki T, Matsumoto A, Kondo S, Sakai T, Sato S, Kikuchi A, Tei Y, Goda T, Miyahara Y, Preparation of environment-sensitive tetra-gel by using stimuli-sensitive macromer, 3rd International Conference on Biomaterials

Science in Tokyo, Tokyo, Japan (東京大学、東京都文京区), November 28-30, 2016.

7. Sakamaki T, Matsumoto A, Kondo S, Sakai T, Sato S, Kikuchi A, Tei Y, Goda T, Miyahara Y, Demonstration of environment-sensitive tetra-gel by using stimuli-sensitive macromer, The International Symposium on Visualization in Joining & Welding Science through Advanced Measurements and Simulation in conjunction with Symposium on the Research Activities of Joint Usage/Research Center on Joining and Welding & The 1st International Symposium on Creation of Life Innovation Materials for Interdisciplinary and International Researcher Development (iLIM-1), Hotel Hankyu Expo Park, Osaka, Japan (大阪府吹田市), October 17-18, 2016.
8. Sakamaki T, Matsumoto A, Kondo S, Sakai T, Sato S, Kikuchi A, Tei Y, Goda T, Miyahara Y, Preparation of environment-sensitive tetra-gel by using stimuli-sensitive macromer, International Symposium on Biomedical Engineering, Tokyo, Japan (東京医科歯科大学、東京都文京区), November 10-11, 2016.
9. Matsumoto A, Takayoshi Suganami, Electronics-free and synthetic materials based approach toward artificial pancreas, Seminar at City of Hope, City of Hope Seminar, Pasadena, USA, August 23, 2016.
10. 松元亮, "ボロノレクチン"を利用した生体計測と DDS, 先端科学・材料技術部会 新素材分科会講演会, 新科学技術推進協会 (東京都千代田区), 2016年5月31日.
11. Matsumoto A, Synthetic gel based approaches towards "electronics-free" artificial pancreas, EPFL, Tokyo Tech, TMDU Joint Workshop, TMDU (東京医科

歯科大学、東京都千代田区), April 19, 2016.

12. Matsumoto A, Phenylboronate based strategies for drug delivery systems and nanobiosensing, 8th International Symposium on Advanced Plasma Science and its Applications for Nitrides and Nanomaterials/9th International Conference on Plasma-Nano Technology & Science (ISPlasma2016 / IC-PLANTS2016), Higashiyama Campus, Nagoya University, Aichi, Japan (愛知県名古屋市), March 6-10, 2016.
13. Matsumoto A, Ishii T, Kataoka K, Matsumoto H, Suganami T, Tanaka M, Ogawa Y, Miyahara Y, Synthetic gel based approach toward "electronics-free" artificial pancreas, The International Chemical Congress of Pacific Basin Societies 2015, Honolulu, Hawaii, USA, December 15-20, 2015.
14. Iizuka D, Goda T, Matsumoto A, Miyahara Y, Sanjoh M, Boronate-based pyrophosphate-specific molecular recognitions, The International Chemical Congress of Pacific Basin Societies 2015, Honolulu, Hawaii, USA, December 15-20, 2015.
15. 松元亮, ボロン酸を利用した生体計測と DDS, コロイド先端技術講座 2015 バイオ・アクティブ・ソフトマター, 日本化学会 (東京都千代田区), 2015年12月2日.
16. Matsumoto A, Tabata M, Yang H, Mannan F, Katayama Y, Goda T, Seichi A, Suzuki K, Miyahara Y, Electrochemical quantitative monitoring of isothermal nucleic acid amplification, 2nd COINS International Symposium, Tokyo, Japan (ライフイノベーションセンター、神奈川県川崎市), November 24, 2015.
17. Matsumoto A, Miyahara Y,

"Borono-lectin" based strategies for biosensing and smart drug delivery systems, 12th International Symposium on Stimuli-responsive Materials, Sonoma, USA, Oct 23-25, 2015.

18. Tabata M, Goda T, Matsumoto A, Miyahara Y, Electrochemical label-free degranulation monitoring for in-situ evaluation of cellular function, the 37th Annual International Conference of the IEEE Engineering in Medicine and Biology Society, Milan, Italy, August 25-29, 2015.

19. Matsumoto A, Synthetic gel based approach toward "electronics-free" artificial pancreas, City of Hope Seminar, Pasadena, USA, August 6, 2015.

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

松元 亮 (Matsumoto Akira)

東京医科歯科大学・生体材料工学研究所・  
准教授

研究者番号：70436541